

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-248572

(43)Date of publication of application : 22.09.1998

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C07H 21/04
C12N 1/21
C12N 9/02
C12Q 1/26
// (C12N 15/09
C12R 1:06)
(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12N 9/02
C12R 1:19)

(21)Application number : 09-055203

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 10.03.1997

(72)Inventor : NISHIYA YOSHIKI
KAWAMURA YOSHIHISA

(54) MODIFIED SARCOSINE OXIDASE AND ITS USE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To prevent the occurrence of positive errors in measuring creatine and creatinine for diagnoses of muscle diseases and renal diseases by reducing reactivity to proline by modifying a protein having sarcosine oxidase activity using a protein engineering method.

SOLUTION: Reactivity of a natural sarcosine oxidase to proline is reduced by a method, etc., in which the 345th phenyl alanine in the amino acid sequence of the formula as a protein having sarcosine oxidase activity, is substituted with alanine, glycine, valine or isoleucine.

```

Met Ser Phe Leu Lys Asp Tyr Asp Val His Val Val Gly Ala Gly Ser
1      10      15
Asp Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gly Gly Val Lys Thr
20      25      30
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Trp Phe His Thr Asn Gly Ser His His
35      40      45
Gly Asp Thr Arg Leu Trp Ala His Ala Tyr Gly Gly Gly Asn Gly Tyr
50      55      60
Val Phe Phe Ala Leu Arg Ala Gly Gly Leu Trp Tyr His Leu Gly Lys
65      70      75      80

Thr Lys Thr Pro Asp Gly His Phe Val Thr Asp Leu His Phe His Phe
325      330      335
Ser Asn Val Ala Thr Ala Ala Gly Thr Ser Gly His Gly Thr Lys Phe
340      345      350
Se. Ser Val Val Gly Gly Thr Leu Ser Gly Leu Thr Val Thr Gly Lys
355      360      365
Thr Gly His Asp Thr Ser His Thr Ser His Asn Arg Pro Ala Leu Lys
370      375      380
Gln Lys Gly Thr Thr
385      390

```

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

13.05.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's
decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-248572

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月22日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	P I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/09 Z N A A
C 0 7 H 21/04		C 0 7 H 21/04 B
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21
9/02		9/02
C 1 2 Q 1/26		C 1 2 Q 1/26

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-55203
(22) 出願日 平成9年(1997) 3月10日

(71) 出願人 000003160
東洋紡績株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(72) 発明者 西矢 芳昭
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内
(72) 発明者 川村 良久
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

(54) 【発明の名称】 改変ザルコシンオキシダーゼおよびその用途

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 蛋白工学的手法によるプロリンに対する反応性が低下した改変ザルコシンオキシダーゼの遺伝子操作技術による大量生産方法及びクレアチニン測定試薬としての利用方法の提供。

【解決手段】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変異させた蛋白質であって、プロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下したものであることを特徴とする改変ザルコシンオキシダーゼおよびその製法ならびに該酵素を使用するクレアチンまたはクレアチニン測定試薬。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ギルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変異させた蛋白質であって、プロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下したものであることを特徴とする改変ギルコシンオキシダーゼ。

【請求項2】 ギルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸が、他のアミノ酸に置換してなる請求項1記載の改変ギルコシンオキシダーゼ。

【請求項3】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第345番目のフェニルアラニンが、他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列（配列表の配列番号2）を有する蛋白質である請求項2記載の改変ギルコシンオキシダーゼ。

【請求項4】 他のアミノ酸がアラニン、グリシン、バリンあるいはイソロイシンである請求項3記載の改変ギルコシンオキシダーゼ。

【請求項5】 下記理化学的性質を有する改変ギルコシンオキシダーゼ。

作用：水および酸素の存在下にギルコシンに作用して、グリシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

至適pH：7.5～8.5

至適温度：40～50℃

安定pH：6.5～9.0（25℃、24時間処理）

安定温度：50℃以下（pH7.5、10分間処理）

基質特性：プロリンに対する反応性が、改変前のタンパク質に比べて、70%以下である。

分子量：約43KDa

アミノ酸配列：配列表の配列番号2に記載される。

【請求項6】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を他のアミノ酸をコードする遺伝子に置換した遺伝子を組み込んだ発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、該培養物からプロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下した改変ギルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変ギルコシンオキシダーゼの製造法。

【請求項7】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第345番目のフェニルアラニンをコードする遺伝子を他のアミノ酸をコードする遺伝子に置換した請求項6記載の改変ギルコシンオキシダーゼの製造法。

【請求項8】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を他のアミノ酸をコードする遺伝子に置換した遺伝子が、配列表の配列番号4に記載されるDNA配列である請求項6記載の改変ギルコシンオキシダーゼの製造法。

【請求項9】 請求項1～5のいずれか1項に記載され

るプロリンに対する反応性が改変前のタンパク質に比して低下した改変ギルコシンオキシダーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ベルオキシダーゼおよび過酸化水素検出試薬を含むクレアチン測定用試薬。

【請求項10】 請求項1～5のいずれか1項に記載されるプロリンに対する反応性が改変前のタンパク質に比して低下した改変ギルコシンオキシダーゼ、クレアチンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ベルオキシダーゼおよび過酸化水素検出試薬を含むクレアチン測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、ギルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白質工学的的手法により改変することにより得られる、プロリンに対する反応性が改変前の野生型ギルコシンオキシダーゼに比して低下した改変ギルコシンオキシダーゼ、および該酵素の製造法およびその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】従来から、ギルコシンオキシダーゼ（EC 1.5.3.1）は、臨床的に糖尿病、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチン、クレアチニンの測定用酵素として、他の酵素、例えばクレアチンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ベルオキシダーゼと共に使用されている。ギルコシンオキシダーゼはその基質であるギルコシンに水、酸素の存在下で作用して、グリシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

【0003】このようなギルコシンオキシダーゼは、バチルス属（特開昭54-52789号公報）、コリネバクテリウム属（J. Biochem. 89, 599 (1981)）、シリンドロカルボン属（特開昭56-92790号公報）、シュードモナス属（特開昭60-43379号公報）等の細菌が生産することが知られている。とりわけ、アースロバクター・エスピーTE1826（FERM P-10637）の生産するギルコシンオキシダーゼは、従来のギルコシンオキシダーゼよりも熱安定性に優れ、かつ、Km値の小さい実用的な酵素であることが既に知られている（特開平2-265478号公報）。

【0004】本発明者らは、既に、アースロバクター・エスピーTE1826（FERM P-10637）より抽出した染色体DNAよりギルコシンオキシダーゼ遺伝子の単離に成功し、そのDNAの全構造を決定し（Journal of Fermentation and Bioengineering Vol. 75 No. 4 pp239-244 (1993)）、該ギルコシンオキシダーゼを遺伝子工学的的手法によって形質転換体に高生産させることに成功し、高純度なギルコシンオキシダーゼを安価に大量供給することを可能にしている（特開平6-113845号公報）。

【0005】しかしながら、ギルコシンオキシダーゼはアミノ酸の1種であるプロリンにも低いレベルではあるが、反応性を示すことが知られている（例えば、特開平

5-115281号公報)。しかし、プロリン、特にL-プロリンは生体を構成する蛋白質の1成分であり、体液中に存在する可能性があるため、体液中のクレアチン、クレアチニンの測定の際に正誤差を生じる原因となり得る。実際、大澤らはクレアチニン測定用試薬における問題点として、該試薬に含まれるザルコシンオキシダーゼのプロリンに対する反応性を挙げている(例えば臨床科学、20、144-152(1991)、生物試料分析、17、332-337(1994)参照)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】従って、野生型ザルコシンオキシダーゼのプロリンに対する反応性を低下させることが望まれていた。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するために種々検討した結果、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白質工学的手法により改変することで、プロリンに対する反応性が野生型ザルコシンオキシダーゼに比して低下した改変ザルコシンオキシダーゼを達成することが可能であることを見いだした。

【0008】すなわち、本発明は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変異させた蛋白質であって、プロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下したものであることを特徴とする改変ザルコシンオキシダーゼである。

【0009】また、本発明は配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を他のアミノ酸をコードする遺伝子にて置換した遺伝子を組み込んだ発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、該培養物からプロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下した改変ザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変ザルコシンオキシダーゼの製造法である。

【0010】さらに、本発明は上記プロリンに対する反応性が改変前のタンパク質に比して低下した改変ザルコシンオキシダーゼ、クレアチンアミドヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼおよび過酸化水素検出試薬を含むクレアチン測定用試薬である。

【0011】また、本発明は上記プロリンに対する反応性が改変前のタンパク質に比して低下した改変ザルコシンオキシダーゼ、クレアチンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミドヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼおよび過酸化水素検出試薬を含むクレアチン測定用試薬である。

【0012】

【発明の実施態様】本発明の改変される前のザルコシンオキシダーゼとしては、特に限定されるものではないが、例えば、バチルス属由来のザルコシンオキシダーゼ、シュードモナス属由来のザルコシンオキシダーゼな

どが挙げられる。

【0013】本発明ではその1例として、アースロバクター・エスピーTE1826(FERP-10637)のザルコシンオキシダーゼ(特開平2-265478号公報、特開平6-113840号公報、Journal of Fermentation and Bioengineering Vol.75 No.4 pp239-244 (1993)に記載)を用いた。アースロバクター・エスピーTE1826由来のザルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列を、配列表の配列番号1に示す。また、これらのアミノ酸配列をコードするDNA配列を、配列表の配列番号3に示す。

【0014】本発明の改変ザルコシンオキシダーゼは、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変異させた蛋白質であって、プロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下したものである。プロリンに対する反応性とは、本来の基質であるザルコシンを基質とした際の酵素活性に対する、プロリンを基質とした酵素活性の割合として定義される。本発明ではプロリンに対する反応性が改変前の蛋白質に比して低下したものであるが、その低下の程度は、約70%以下である。

【0015】本発明の一実施態様としては、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸が、他のアミノ酸に置換してなる改変ザルコシンオキシダーゼがある。

【0016】さらに、本発明の一実施態様としては、配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第345番目のフェニルアラニンが、他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列(配列表、配列番号2)を有する蛋白質である。

【0017】また、本発明の一実施態様としては、他のアミノ酸がアラニン、グリシン、バリンあるいはイソロイシンである改変ザルコシンオキシダーゼがある。

【0018】さらに、具体的な実施態様としては下記理化的性質を有する改変ザルコシンオキシダーゼがある。

作用：水および酸素の存在下にザルコシンに作用して、グリシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

至適pH：7.5~8.5

至適温度：40~50℃

安定pH：6.5~9.0(25℃、24時間処理)

安定温度：50℃以下(pH7.5、10分間処理)

基質特異性：プロリンに対する反応性が、改変前のタンパク質に比べて、70%以下である。

分子量：約43KDa

アミノ酸配列：配列表の配列番号2に記載される。

【0019】本発明の改変ザルコシンオキシダーゼは、以下に示す手順で製造することが可能である。まず、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するア

ミノ酸配列を改変する方法としては、通常、行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、ザルコシンオキシゲナーゼ活性を有する蛋白質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を交換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を交換する具体的な方法としては、例えば市販のキット(Transformer™; Clontech 製、EXDIII/Mung Bean Deletion Kit; Stratagene 製)などを使用するか、またはPCRの利用が挙げられる。

【0020】作成された改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変蛋白質を生産する形質転換体となる。この際のプラスミドとしては、例えばエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pBluescript、pUC18などが使用できる。また、他の細菌、例えばバチルス属細菌を宿主とする場合には、pUB110、pHY300PLKなどが使用できる。宿主微生物としては、例えばエシェリヒア・コリー W3110、エシェリヒア・コリー C600、エシェリヒア・コリー JM109、エシェリ

育し、改変蛋白質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0~9.0程度である。

【0023】培養物中の改変蛋白質を生産する菌体を含む培養液を、そのまま採取し利用することもできるが、一般には菌法に従って、改変蛋白質が培養液中に存在する場合は遠心分離などにより、改変蛋白質含有溶液と微生物菌体とを分離した後利用される。改変蛋白質が菌体内に存在する場合には、得られた培養液から遠心分離または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して改変蛋白質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0024】このようにして得られた改変蛋白質含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフ

下のように行なった。すなわち、48 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH8.0)、9.5 mM ギャルコシン、0.47 mM 4-アミノアンチピリン、2.0 mM フェノール、0.045% トリトン X-100、4.5 U/ml ベルオキシダーゼ中で、酵素を37℃、10分反応させ、500 nm における吸光度を測定する。酵素活性の1単位 (U) は、この条件下で1分間当たり1マイクロモルの過酸化水素を生成する酵素量とした。また、レブロリンに対する反応性は、上記組成中のギャルコシンをレブロリンに置き換えた際の活性の相対比として測定した。

【0028】**実施例1** ギャルコシンオキシダーゼの改変ギャルコシンオキシダーゼの遺伝情報を有する組換え体プラスミド、pSACEP3 をジャーナル・オブ・ファーマンテーション・アンド・バイオエンジニアリング (Journal of Fermentation and Bioengineering) Vol.75 No.4 pp239-244 (1993)に記載の方法に従い、以下のようにして調製した。まず、アースロバクター・エスピーTE1826 (FERM P-10537)の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を100 ml の2×YT培地 (1.6%ポリペプトン、1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム (pH7.2))で37℃一晩振盪培養後、遠心 (8000rpm、10分) により集菌した。1.5 ml クエン酸ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウムを含んだ溶液で菌体を洗浄した後、20%シュウクロース、1 mM EDTA、50 mM トリス塩酸 (pH7.6) を含んだ溶液5 ml に懸濁させ、0.5 ml のリゾチーム溶液 (100mg/ml) を加えて、37℃、30分間保温した。次いで1.1 ml の1%ラウロイルギャルコシン酸、0.1 M EDTA (pH9.5) を含む溶液を加えた。

【0029】この懸濁液に臭化エチジウム溶液を0.5%塩化セシウムを約100%加え、攪拌混合し、55,000 rpm、20時間の超遠心でDNAを分取した。分取したDNAは、10 mM トリス塩酸 (pH8.0)、1 mM EDTA を含んだ溶液 (TE) で透析し、精製DNA標品とした。

【0030】精製DNA標品1 μg を制限酵素 Sau3AI (東洋紡製) で部分分解反応させ、2 kb 以上の断片に分解した後、SalIII (東洋紡製) で切断した、pUC180.5 μg を用い、M.G.Loftus 社の BACKFILLING 法 (Biotechniques Vol.12, No.2 (1992)) に従い、T4-DNA リガーゼ (東洋紡製) 1 ユニットで16℃、12時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAは、Hahnahan の方法により作成したエシェリヒア・コリー JM109 のコンピテントセルを用いて形質転換した。使用したDNA 1 μg 当たり約 1×10⁶ 個の形質転換体のコロニーが得られた。得られたコロニーは50 μg/ml アンピシリン、0.5% ギャルコシン、0.005% パラオースアニリンおよび0.02% ソディウムヒドロキシジェンサルファイト入り培地 (1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム) で37℃、18時間培養し、赤色コロニーを指標にギャルコシンオキシダーゼ遺伝子が入った組換え

DNA をスクリーニングした。

【0031】その結果、約1,600 個のコロニーのうち1株の割合で赤色を示すコロニーを得た。この中の1株が保有するプラスミドには約8.7 kb の挿入DNA断片が存在しており、このプラスミドをpSAC1 とした。次いでpSAC1 より挿入DNA断片を種々の制限酵素により切断してpUC18 にサブクローニングし、約1.7 kb の挿入DNA断片を有するpSACEP3 を得た。

【0032】配列表の配列番号3にpSACEP3 の挿入DNA断片のDNA配列を、配列表の配列番号1にpSACEP3 の挿入DNA断片中にコードされているギャルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列をそれぞれ記載している。該組換えプラスミドpSACEP3 を基に、配列表の配列番号5のオリゴヌクレオチドとDNA中の塩基を交換するキットであるTransformer™ (Clontech製) を用い、Transformer™ のプロトコルに従い、変異処理操作を行った。その結果、配列表の配列番号1記載の第345番目のフェニルアラニンがアラニンに置換された改変蛋白質 F345A (配列表の配列番号2記載) の遺伝情報を有するDNAを保持するプラスミドを作成した。

【0033】該改変ギャルコシンオキシダーゼの遺伝情報を有するDNAを種々の制限酵素で切断してサブクローニングを調製し、常法に従い、シーケンシング・キット (SEQUENCING PRO 7-deaza-dGTP kit、東洋紡製) を用いて塩基配列を決定し、改変されていることを確認した。該改変ギャルコシンオキシダーゼの遺伝情報を有するDNAを保持する組換え体プラスミドでエシェリヒア・コリー JM109 のコンピテントセルを形質転換し、形質転換体をそれぞれ得た。

【0034】**実施例2** 形質転換体の培養と改変蛋白質の精製
2×YT培地 (1.6%ポリペプトン、1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム (pH7.2)) 50 ml を500 ml フラスコに分注し、121℃、15分間オートクレーブを行い放冷後、別途無菌滅菌した50 mg/ml アンピシリン (ナカライテスク製) を0.1%添加した。この培地に上記と同一組成の培地で、予め37℃で18時間振盪培養した形質転換体の培養液1 ml を接種し、37℃で通気攪拌培養した。

【0035】培養液より改変蛋白質を、ジャーナル・オブ・ファーマンテーション・アンド・バイオエンジニアリング (Journal of Fermentation and Bioengineering) Vol.75 No.4 pp239-244 (1993) 記載のギャルコシンオキシダーゼの精製法に従い、超音波破碎、核酸酸処理、硫酸アンモニウム塩析、DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー、ゲル透過カラムクロマトグラフィーの工程を順次、実施し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて単一のバンドを形成するまで精製した。

【0036】**実施例3** 改変蛋白質の評価
精製された改変ギャルコシンオキシダーゼと野生型ギャルコ

シンオキシダーゼの、L-プロリンに対する反応性をザ
ルコシンに対する反応性を比較した。その結果を表1に
示す。 * 【0037】
【表1】

ザルコシンオキシダーゼ	活性相対比(%)	
	ザルコシン	L-プロリン
野生型	100	0.95
改変蛋白質(F345A)	100	0.66

【0038】表1から明かなように、改変ザルコシン
オキシダーゼ F345AのL-プロリンに対する反応性は、
野生型ザルコシンオキシダーゼのL-プロリンに対する
反応性より低下していることを示している。また、ザル
コシンに対する絶対的な反応性を表す比活性は、野生型
ザルコシンオキシダーゼが約20U/mgであるのに対
し、改変ザルコシンオキシダーゼ F345Aは約18U/g
mgとほとんど遜色なかった。すなわち、改変ザルコシ
ンオキシダーゼは絶対的な酵素性能をほとんど損なうこ
となく、L-プロリンに対する反応性が野生型ザルコシ
ンオキシダーゼより低下していることが明らかとなっ
た。なお、他の性質は野生型ザルコシンオキシダーゼと
ほぼ、同じ性質であった。

【0039】

【発明の効果】本発明によって、ザルコシンオキシダー
ゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手法を用いて改変
し、プロリンに対する反応性が低下した改変ザルコシ
ンオキシダーゼを供給することが可能となった。本発明の
改変ザルコシンオキシダーゼは、細菌の系での遺伝子操※

※作技術による大量生産を実施することができる。また、
本発明の改変ザルコシンオキシダーゼを臨床的に筋炎
、 腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチ
ン、クレアチニンの測定用酵素として、プロリンの影響
を受けることなく、検体中のクレアチン、クレアチニン
の量を正確、迅速に測定するために使用することができ
る。

【0040】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：389

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

起源

生物名：アースロバクター・エスピー (Arthrobacter S
P.)

株名：TE1826

配列

```

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
1           5           10          15
Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr
20          25          30
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
35          40          45
Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
50          55          60
Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
65          70          75          80
Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
85          90          95
Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
100         105         110
Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
115         120         125
Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu
130         135         140
Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
145         150         155         160

```


(7)

特開平10-248572

11

12

Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
 165 170 175
 Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr
 180 185 190
 Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn
 195 200 205
 Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr
 210 215 220
 Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn
 225 230 235 240
 Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr
 245 250 255
 Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His
 260 265 270
 Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly
 275 280 285
 Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
 290 295 300
 Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
 305 310 315 320
 Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
 325 330 335
 Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
 340 345 350
 Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
 355 360 365
 Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
 370 375 380
 Gln Lys Glu Thr Ile
 385 389

【0041】配列番号: 2

配列の長さ: 389

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

他の情報:

* X a a はフェニルアラニン以外のアミノ酸を示す。

起源

生物名: アースロバクター・エスピー (Arthrobacter S P.)

株名: TE1826

*

配列

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr
 20 25 30
 Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
 35 40 45
 Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
 50 55 60
 Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
 65 70 75 80
 Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
 85 90 95
 Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys

BEST AVAILABLE COPY

(8)

特開平10-248572

13 100 105 110 14

Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
115 120 125

Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu
130 135 140

Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
145 150 155 160

Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
165 170 175

Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr
180 185 190

Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn
195 200 205

Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr
210 215 220

Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn
225 230 235 240

Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr
245 250 255

Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His
260 265 270

Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly
275 280 285

Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
290 295 300

Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
305 310 315 320

Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
325 330 335

Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Xaa Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
340 345 350

Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
355 360 365

Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
370 375 380

Gln Lys Glu Thr Ile
385 389

【0042】配列番号: 3

配列の長さ: 1670

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: genomic DNA

起源

40 生物名: アースロバクター・エスピー (Arthrobacter S P.)

* 株名: TE1826

配列

CTGCAGTCT TCCTCCAGCT TTTCAATGCT CACGGTAACA TAAGATTGAA CATAATTAA 60
ACCTTTTGGCC GCGTTTGAAA GCGTCCATA TTCAACTACC TTTTGAAAAA TCTGCAATC 120
TTTAATTTCC AAGTATAATC ACTCCCAAAA CGTTCTTTTA CTACTAGCAC TAGAATATTT 180
CTAAAAGTGA TAGCTGCTAT CACTTTTAAG CATTTTACAT GATGGCCAAT AGGCGGTATG 240
ATGTAATAG ATAATTAAGA AAATTCAAAT TACCTGTTTG AAAAAGGAGA GCAAA 297
ATG AGT ATT AAA AAA GAT TAT GAT GTA ATT GTG GTT GCG GCT GGT TCC 345
Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser

BEST AVAILABLE COPY

(9)

待開平 10-248572

15					16	
1	5	10	15			
ATG GGA ATG GCA GCT GCG TAC TAT CTG TCT AAA CAA GGT GTT AAA ACA	393					
Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr						
20	25	30				
CTA TTG GTA GAT TCA TTT CAT GCT CCC CAT ACA AAT GGC AGC CAT CAT	441					
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His						
35	40	45				
GCC GAT ACA CGG ATC ATT CGT CAC GCA TAT GGC GAA GGA AGA GAG TAT	489					
Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr						
50	55	60				
GTA CCG TTT GCG TTG AGA CCA CAA GAG TTA TGG TAT GAA TTA GAA AAG	537					
Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys						
65	70	75	80			
GAG ACT CAT CAT AAA ATA TTT ACA AAA ACA GGT GTA CTC GTT TTT GGT	585					
Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly						
85	90	95				
GCT AAA GGA GAA GCT CCT TTC GTT GCC GAA ACA ATG GAA GCC GCA AAG	633					
100	105	110				
GAA CAT TCA TTA GAT GTT GAT TTA CTA GAA GGA AGT GAA ATA AAT AAG	681					
Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys						
115	120	125				
GCT TCG CCA GGT GTA ACG GTT CCT GAG AAT TAT AAT GCT ATT TTT GAA	729					
Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu						
130	135	140				
AAA AAT TCT GGT GTC TTA TTT AGT GAA AAT TGT ATT GCG GCT TAC GGT	777					
Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg						
145	150	155	160			
GAA TTG GCG GAA GCA AAT GGT GCG AAA GTT CTA ACG TAC ACA CCC GTT	825					
Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val						
165	170	175				
GAA GAT TTC GAG ATT GCG GAG GAC TTC GTC AAA ATC CAA ACC GCC TAT	873					
Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr						
180	185	190				
GCC TCC TTT ACA GCC AGT AAA TTA ATT GTT AGC ATG GCG GCT TGG AAT	921					
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn						
195	200	205				
ACC AAA CTG CTA TCA AAA TTA AAT ATT GAA ATC CCA TTG CAG CCA TAC	969					
Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr						
210	215	220				
GCT CAA GTT GTC GGA TTC TTC GAA TGT GAT CAA AAA AAA TAT AGC AAT	1017					
Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn						
225	230	235	240			
ACA CAT GGT TAT CCG GCG TTC ATG GTC GAA GTC CCA ACT GGC ATC TAT	1065					
Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr						
245	250	255				
TAC GGA TTT CCA AGC TTC GCG GCG TGC GCG TTG AAA ATA GCG TAT CAT	1113					
Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His						
260	265	270				
ACG TAT GGT CAA AAA ATC GAT CCA GAT ACG ATT AAT GGT GAA TTT GGT	1161					
Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly						

BEST AVAILABLE COPY

(10)

特開平10-248572

17
275 280 285
ATT TAC CCG GAG GAT GAA GCG AAT ATT CCG AAA TTC CTG GAA ACA TAT 1209
Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
290 295 300
ATG CCG GGA GCA ACC GCG GAA TTA AAA AGT GCG GCA GTT TCC ATG TAC 1257
Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
305 310 315 320
ACA AAA ACA CCT GAT GAG CAT TTC GTG ATT GAT TTA CAT CCT CAA TTC 1305
Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
325 330 335
TCG AAT GTC CCG ATT GCA GCG GGA TTC TCC GCA CAT GCG TTT AAA TTC 1353
Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
340 345 350
TCA ACC GTA GTT GGT GAA ACA TTA AGT CAA TTA GCT GTA ACC GGT AAA 1401
Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
355 360 365
ACA GAA CAC GAT ATT TCC ATC TTT TCA ATC AAT CCG CCT GCT TTA AAA 1449
Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
370 375 380
CAA AAA GAA ACC ATT TAAAAACCA AGCAAGCGT ACATAAATTT CGATAGATAT 1504
Gln Lys Glu Thr Ile
385
TATGTACGGC TTACTTTATT TACAACTTAA AAATCTGCAT ATCAATCCTG TCCCTCTACT 1564G
ATTGAAGCA CAACTGTAC TTGAACGGCT TTTTATTATA CTGTAAAGCA TAACAGGAAC 1624CC
TAAAAATA GAACACCGCT GCATAAGAAT AGTACCGGAG GAATTC 1670

【0043】配列番号: 4

配列の長さ: 1670

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源

* 生物名: アースロバクター・エスビー (Arthrobacter S P.)

株名: TE1826

他の情報:

30 NはA又はC又はG又はTもしくはUを示す。

Xaaはフェニルアラニン以外のアミノ酸を示す。

*

配列

CTGCAGTTCT TCCTCAGCT TTTGAATCCT CACCGTAACA TAAGATTGAA CATAATTTAA 60
ACTTTTGGCC GCCTTTGAAA CGCTGCCATA TTCAACTACC TTTTGAAAAA TCTGCAATC 120
TTTAATTTCC AAGTATAATC ACTGCCAAAA CGTTCTTTTA CTACTAGCAC TAGAATATTT 180
CTAAAAGTGA TAGCTGCTAT CACTTTTAAG CATTTTACAT GATGCCCAAT AGCGCGTATG 240
ATGTAAATAG ATAATTAAGA AAATTCAAAT TACCTGTTTG AAAAAGGAGA GCAAAACA 297
ATG AGT ATT AAA AAA GAT TAT GAT GTA ATT GTG GTT GCG GCT GGT TCC 345
Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
1 5 10 15
ATG GCA ATG GCA GCT GCG TAC TAT CTG TCT AAA CAA GGT GTT AAA ACA 393
Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr
20 25 30
CTA TTG GTA GAT TCA TTT CAT CCT CCC CAT ACA AAT GCG AGC CAT CAT 441
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
35 40 45
GCG GAT ACA CCG ATC ATT CGT CAC GCA TAT GCG GAA GCA AGA GAG TAT 489
Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
50 55 60

BEST AVAILABLE COPY

19
GTA CCG TTT GCC TTG AGA GCA CAA GAG TTA TGG TAT GAA TTA GAA AAG 537
Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
65 70 75 80
GAG ACT CAT CAT AAA ATA TTT ACA AAA ACA GGT GTA CTC GTT TTT GGT 585
Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
85 90 95
GCT AAA GGA GAA GCT CCT TTC GTT GCC GAA ACA ATG GAA GCC GCA AAG 633
Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
100 105 110
GAA CAT TCA TTA GAT GTT GAT TTA CTA GAA GGA AGT GAA ATA AAT AAG 681
Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
115 120 125
GGT TGG CCA GGT GTA ACG GTT CCT GAG AAT TAT AAT GCT ATT TTT GAA 729
Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu
130 135 140
AAA AAT TCT GGT GTC TTA TTT AGT GAA AAT TGT ATT CCC GCT TAC GGT 777
Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
145 150 155 160
GAA TTG CCG GAA CCA AAT GGT CCG AAA GTT CTA ACG TAC ACA CCC GTT 825
Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
165 170 175
GAA GAT TTC GAG ATT CCC GAG GAC TTC GTC AAA ATC CAA ACC GCC TAT 873
Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr
180 185 190
GCC TGC TTT ACA CCC AGT AAA TTA ATT GTT AGC ATG GCC GCT TGG AAT 921
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn
195 200 205
AGC AAA CTG CTA TCA AAA TTA AAT ATT GAA ATC CCA TTG CAG CCA TAC 969
Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr
210 215 220
GGT CAA GTT GTC CGA TTC TTC GAA TGT GAT GAA AAA AAA TAT AGC AAT 1017
Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn
225 230 235 240
ACA CAT GGT TAT CCG CCG TTC ATG GTC GAA GTC CCA ACT GCC ATC TAT 1065
Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr
245 250 255
TAC GGA TTT CCA AGC TTC GGC GCC TGC GCC TTG AAA ATA GCC TAT CAT 1113
Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His
260 265 270
ACG TAT GGT CAA AAA ATC GAT CCA GAT ACG ATT AAT GGT GAA TTT GGT 1161
Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly
275 280 285
ATT TAC CCG GAG GAT GAA CCG AAT ATT CCC AAA TTC CTG GAA ACA TAT 1209
Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
290 295 300
ATG CCG GGA GCA ACC GCC GAA TTA AAA AGT CCG GCA GTT TGC ATG TAC 1257
Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
305 310 315 320
ACA AAA ACA CCT GAT CAG CAT TTC GTG ATT GAT TTA CAT CCT CAA TTC 1305
Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe

(12)

特開平10-248572

21

22

325 330 335
 TCG AAT GTC GCG ATT GCA GGC GGA NNN TCC GGA CAT GCG TTT AAA TTC 1353
 Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Xaa Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
 340 345 350
 TCA ACC GTA GTT GGT GAA ACA TTA AGT CAA TTA GCT GTA ACC GGT AAA 1401
 Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
 355 360 365
 ACA GAA CAC GAT ATT TCC ATC TTT TCA ATC AAT GGC CCT GCT TTA AAA 1449
 Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
 370 375 380
 CAA AAA GAA ACG ATT TAAAAAGCA AGCAAGCGT ACATAAATTT CGATAGATAT 1504
 Gln Lys Glu Thr Ile
 385
 TATGTACGGC TTACTTTATT TACAACTTAA AAATCTGCAT ATCAATCCTG TCCCTCTACT 1564
 GATTGAAGCA CAAACTGTAC TTGAACGGCT TTTTATTAA CTTGTAACGA TAACAGGAAC 1624

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. [°]	識別記号	F I
//(C12N 15/09	Z N A	
C12R 1:06)		
(C12N 1/21		
C12R 1:19)		
(C12N 9/02		
C12R 1:19)		

BEST AVAILABLE COPY